

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. Th. Schliesser
und
der Sektion Gnotobiotik der Universität Ulm/Donau

Untersuchungen zur Frage der intrauterinen Infektion mit *Mycoplasma Pulmonis* bei Ratten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Dieter Vahldieck
Tierarzt aus Stendal/Altmark

Gießen 1973

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. Th. Schliesser
und
der Sektion Gnotobiotik der Universität Ulm/Donau

Untersuchungen zur Frage der intrauterinen Infektion mit *Mycoplasma Pulmonis* bei Ratten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Dieter Vahldieck
Tierarzt aus Stendal/Altmark

Gießen 1973

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin

in Gießen

Dekan:

Prof. Dr. E. WEISS

Berichterstatter:

Prof. Dr. Th. SCHLIESSER

Tag der mündlichen

Prüfung: 11.10.1973



MEINEN ELTERN

IN

DANKBARKEIT

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Literatur	2
2.1. Allgemeines über Mykoplasmen	2
2.2. Mycoplasma pulmonis. Eigenschaften und Vorkommen	3
2.3. Mycoplasma pulmonis als Krankheits- erreger bei Ratten und Mäusen	4
2.4. Übertragung von Mycoplasma pulmonis auf keimfrei gehaltene Ratten und Mäuse	5
3. Eigene Untersuchungen	10
3.1. Material und Methoden	10
3.1.1. Versuchstiere	10
3.1.2. Züchtung von Mykoplasmen	11
a) Nährböden	11
b) Reinzüchtung	12
c) Vermehrung zwecks Inokulation	13
3.1.3. Untersuchungsgang	14
a) Infektion der Tiere	14
b) Gewinnung des Untersuchungsmaterials	15
c) Bearbeitung des Untersuchungs- materials	16
d) Untersuchungen auf Mycoplasma pulmonis und Begleitbakterien	17

	Seite
3.2. Untersuchungsergebnisse	19
3.2.1. Untersuchungen über das natürliche Vorkommen von <i>Mycoplasma pulmonis</i> bei Ratten	19
3.2.2. Untersuchungen an experimentell infizierten, trächtigen, keimfreien Ratten	21
3.2.3. Untersuchungen an experimentell infizier- ten, trächtigen, konventionellen Ratten	28
4. Diskussion	39
4.1. Zur Methodik	39
4.2. Zur Versuchsanordnung	40
4.3. Besiedlung des Uterus mit <i>Mycoplasma pulmonis</i> nach experimenteller Infektion trächtiger Ratten	42
4.4. Die ovarielle Kontamination als Voraussetzung für infizierte Eizellen	44
4.5. Möglichkeiten der diaplazentalen Übertragung	45
4.6. Die Bedeutung der intrauterinen Übertragung von <i>Mycoplasma pulmonis</i> auf Föten für die Versuchstierzucht	47
5. Zusammenfassung	49
6. Literaturverzeichnis	51

1. Einleitung

Für Erkrankungen des Respirationstraktes bei Ratten und Mäusen werden verschiedene Erreger verantwortlich gemacht. Einer davon ist *Mycoplasma pulmonis*. Es hat sich herausgestellt, daß ein großer Prozentsatz konventioneller, mitunter aber auch keimfreier Tiere mit dieser Mykoplasmenart latent infiziert ist. Unter Versuchsbedingungen können bei entsprechenden Belastungen latente Mykoplasmosen aktiviert werden und zum Bild der akuten oder später chronischen Pneumonie führen.

Die Frage der Übertragung von *Mycoplasma pulmonis* ist allerdings noch nicht restlos geklärt. Längere Zeit bestand die Ansicht, daß eine Ansteckung nur post partum auftritt und die Plazenta eine 100 %ige Barriere darstellt. Die Isolierung von *Mycoplasma pulmonis* bei keimfreien Tieren und experimentelle Untersuchungen lassen jedoch vermuten, daß unter anderem die Möglichkeit einer diaplazentaren Übertragung besteht. Für die Gewinnung keimfreier Tiere in der Versuchstierzucht würde das bedeuten, daß über die üblichen Kontrollen hinaus auch noch ständig auf Mykoplasmen untersucht und somit ein anderer Maßstab als bisher angelegt werden müßte.

Als meine Aufgabe stellte sich somit die Klärung der Frage, welche Bedeutung der diaplazentaren Übertragung von *Mycoplasma pulmonis* bei Ratten zukommt und auf welchem Wege in der Versuchstierzucht die Gewinnung mykoplasmenfreier Tiere zu erzielen ist.

2. Literatur

2.1. Allgemeines über Mykoplasmen

Mykoplasmen wurden ursprünglich als Pleuro-Pneumonia-Like-Organism (abgekürzt PPLO) bezeichnet. Dieser Name leitete sich von dem Erreger der Lungensuche des Rindes ab, dessen heutige Bezeichnung "Mycoplasma mycoides" ist.

Die Mykoplasmen kommen sowohl bei Menschen und Tieren als auch in der freien Natur gleichermaßen vor und sind in der letzten Zeit vielfach als Krankheitserreger beschrieben worden.

Es handelt sich bei ihnen um die kleinsten bekannten, in zellfreien Medien vermehrungsfähigen Organismen. Sie haben eine Größe von durchschnittlich 125 bis 250 nm. Da sie keine Zellwand besitzen, sind sie pleomorph und deshalb von ihrer Form her nicht zu unterscheiden.

Charakteristisch für die Mykoplasmen (mit Ausnahme von *Mycoplasma laidlawii*) ist die Abhängigkeit von Cholesterin als Wachstumsfaktor, das für den Aufbau der Zellmembran benötigt wird.

Auf festen Nährmedien tritt spiegeleiförmiges Koloniewachstum auf, das für Mykoplasmen mehr oder weniger als typisch zu bezeichnen ist. Die biphasische Kolonieform kommt durch ein verstärktes Wachstum des Zentrums der Kolonie in das Medium zustande, wobei der Wassergehalt der Nährmedien eine große Rolle spielt.

Auch soll der Gehalt an Hefeextrakt und dessen Herstellung für die Koloniemorphologie von Bedeutung sein. Penicillin und Thalliumsalze sind für die Mykoplasmen, mit Ausnahme der T-strains, keine Inhibitoren.

2.2. Mycoplasma pulmonis, Eigenschaften und Vorkommen.

Mycoplasma pulmonis läßt sich sowohl auf festen Medien, als auch in Bouillon kultivieren. Dabei ist die Bebrütungsart, ob aerob oder anaerob, für das Wachstum unbedeutend. Voraussetzung ist jedoch ein Gehalt des Mediums von 10 bis 20 % Pferdeserum. Weniger Serum oder verschiedene Serumfraktionen erschweren die Adaption erheblich oder machen ein Wachstum unmöglich. Die Morphologie auf festen Medien variiert erheblich zwischen granulären und filamentären Kolonien. Im allgemeinen zeigen die Kolonien eine geringe Tendenz, in das Medium hinein zu wachsen und damit biphasisch zu erscheinen. Dagegen kann sich das Oberflächenwachstum zu einem aus Vakuolen bestehenden Netzwerk ausdehnen. Immer wieder weisen die Kolonien dunkelbraune Pigmentierungen auf. Aber auch sie sind stark von Mediumzusätzen abhängig. Durch die Fähigkeit, Glucose zu Säure zu dehydrogenieren, kann Mycoplasma pulmonis leicht bei Anwesenheit eines entsprechenden Indikators von Mycoplasma arthritidis unterschieden werden.

Die Überlebensfähigkeit beträgt sowohl im Wasser als auch auf angetrocknetem Filterpapier 14 - 22 Tage (JUHR 1971).

Außerdem soll Mycoplasma pulmonis eine gewisse Mobilität in Frühpassagen besitzen, ohne daß jedoch besondere Fortbewegungsmittel diese Beobachtung unterstützen könnten (ADREW et al 1946, NELSON 1960).

Mycoplasma pulmonis kommt bei Ratten und Mäusen vor und konnte bisher aus Nase, Rachen, Mittelohr, Kehlkopf, Trachea, Lunge, Konjunktivalabstrichen, Vagina, Praeputium, aus Kot, Urin, Käfigeinstreu, Tränkflaschen und der Luft isoliert werden (JUHR 1971). Bei Mäusen wurde der Erreger auch aus Gehirn, Leber und Plasmazell-Tumoren angezüchtet.

2.3. Mycoplasma pulmonis als Krankheitserreger bei Ratten und Mäusen

Mycoplasma pulmonis gilt als Erreger der sog. "chronic respiratory disease" (=CRD), einer bei in Zuchten gehaltenen Ratten und Mäusen weit verbreiteten Erkrankung.

Bei wildlebenden Ratten und Mäusen ist diese Erkrankung bisher kaum beobachtet worden. Diese Tatsache ist entweder auf die geringe Empfindlichkeit der nicht domestizierten Tiere zurückzuführen, oder durch die unphysiologischen Haltungsbedingungen und den stark verkleinerten Lebensraum von Laborratten und Mäusen bedingt. Nach Gärtner (1968) wird durch die Frequenz der direkten Kontakte die Wahrscheinlichkeit der Übertragung erheblich potenziert. Daher nimmt die Anzahl der Erkrankungen an CRD zu, je häufiger gesunde mit kranken Tieren zusammentreffen, wobei die Kontaktdauer der einzelnen Zusammentreffen bedeutungslos ist.

Für den Infektionsweg kommt der Nase als Ein- und Austrittspforte die größte Bedeutung zu (NELSON 1967). Nach der Kontamination können die Mykoplasmen auf der nasalen Schleimhaut verbleiben, ohne Ausbreitungstendenz zu zeigen und ohne klinische Anzeichen hervorzurufen. Viel häufiger jedoch gelangen die Mykoplasmen über die Trachea in die Lunge und über die Eustachische Röhre in das Mittelohr (NELSON 1967).

Die Ausbreitung der Mykoplasmen scheint sowohl von einer stressbedingten Änderung der Widerstandsfähigkeit, als auch von Veränderungen im Bronchialsystem abhängig zu sein.

LEMCKE (1961) konnte z.B. nachweisen, daß der Antikörpertiter mit dem Grad der Bronchiektasie steigt. Nach KLIENECKER et al (1955) kommt es auch proportional zum Alter zu einer kontinuierlichen Ausbreitung entlang des Respirationssystems.

Der Beginn der CRD drückt sich i.d.R. in keinerlei klinischen Erscheinungen aus. Durch das lange Bestehen der Infektion

und den sich daraus ergebenden chronischen Veränderungen werden aber Sekundärinfektionen oder eine festere Haftung der Mykoplasmosen ermöglicht (NELSON 1967). Erst in diesem Stadium tritt dann das typische Krankheitsbild in Form eines infektiösen Katarrhs mit Rhinitis, Otitis media und Pneumonie auf (GÄRTNER 1968). Das pathologische Bild der CRD ist das einer mehr oder weniger unspezifischen bronchopneumonischen Veränderung.

Die histopathologischen Veränderungen sind teilweise sehr mannigfaltig und ihrer Ätiologie nach nicht immer genau abzuklären. Von einigen Autoren wird die enzootische Bronchiektasie auch als Virusinfektion bezeichnet. Jedenfalls kann die CRD unter Stress-Einwirkung zu einer akuten Pneumonie mit letalem Ausgang aktiviert werden.

2.4. Die Übertragung von Mycoplasma pulmonis auf keimfrei gehaltene Ratten und Mäuse.

Die Infektion von keimfreien Ratten und Mäusen mit Mycoplasma pulmonis kann nach JUHR (1970) auf drei verschiedene Ursachen zurückgeführt werden:

- a) Auf eine postnatale Kontamination mit Mykoplasmen, infolge eines Durchbruches im Barriersystem.
- b) Auf eine praenatale intrauterine Kontamination, die auf verschiedenen Wegen möglich ist.
- c) Als Folge der Sectio caesarea.

Für einen Durchbruch im Barriere - System spricht die weitverbreitete Ansicht, daß durch Kaiserschnitt gewonnene Tiere frei von allen Mykoplasmen, Bakterien und Protozoen sind. Nach FORSTER (1963) wirkt die fötale Plazenta wie ein sehr wirksamer Filter und bewahrt erfahrungsgemäß die Foeten von allen Bakterien und den meisten Viren, die vom Muttertier auf die Embryonen übertreten können. Mit Hilfe der Sectio

caesarea können deshalb mit gewöhnlichen Erregern infizierte Tierbestände in den keimfreien Status überführt werden.

KLIENEGER et al (1955) wiesen nach, daß junge, durch Sectio caesarea gewonnene Ratten mykoplasmenfrei waren, während junge entwöhnte Ratten bereits eine Kontamination des Nasenrachenraumes mit Mykoplasmen aufwiesen.

Auch NELSON (1967) kommt zu dem Ergebnis, daß es für die intrauterine Übertragung keine Beweise gibt, vielmehr sind Mykoplasmen erst vom 7. Lebenstag an bei Jungratten nachzuweisen.

WAGNER (1955) und WEDERITSCH (1963) bestätigten Mykoplasmenfreiheit auch bei keimfreien Mäusen. LUTSKY (1968) versuchte bei keimfreien Mäusen vergeblich Mykoplasmen nachzuweisen. Sowohl durch Hysterektomie gewonnene und durch Ammen aufgezogene Tiere, als auch im Isolator gezüchtete keimfreie Mäuse erwiesen sich als mykoplasmenfrei.

Als mögliche Durchbruchwege im Barriere-System kommen in Frage:

- a) der Schleusenprozess,
- b) Beschädigung am Isolator,
- c) das Belüftungssystem.

Im ersten Fall werden durch das Desinfizieren und Autoklavieren der einzuschleusenden Gegenstände die Mykoplasmen bei ordnungsgemäßem Betrieb wohl mit Sicherheit abgetötet. Über ein Eindringen von Mykoplasmen in defekte Isolatoren ist bisher noch nichts bekannt. Dagegen sind gewisse Voraussetzungen für ein Passieren von Mykoplasmen durch Bakterienfilter im Belüftungssystem infolge der Größe der Mykoplasmen und ihrer Fähigkeit, in Aerosolen vorzukommen, gegeben. Die Größe liegt nach mikroskopischen Auswertungen von RÖCKL und NASEMAN (1956) FREUNDT (1960), WILDFÜHR (1961) und SCHIMMEL (1967) etwa zwischen 125 und 700 nm. Nach WILDFÜHR (1961) haben Ultrafiltra-

tionsversuche für die kleinste vermehrungsfähige Einheit sogar eine Größe von 100 - bis 150nm ergeben.

Nach Befunden von KUNDSIN (1967) können Mykoplasmen in Aerosolen vorkommen. Ihre Überlebensfähigkeit, die allerdings nach Ergebnissen von BALLEY (1967) und O'CONNEL (1963) direkt von der Luftfeuchtigkeit abhängig ist, kann dabei bis zu 5 Std. betragen.

Für den zweiten Fall, die praeinatale intrauterine Kontamination sprechen folgende Untersuchungen:

GRAHAM (1963) bezweifelt, daß durch Sectio caesarea gewonnene Jungtiere frei von Mykoplasmen sind.

FLYNN et al (1968) konnten bei Mäuseföten Mykoplasmen nachweisen. Sie machten den Vorschlag, solange der Infektionsweg bei keimfreien Tieren nicht nachgewiesen ist, von der Annahme auszugehen, daß durch Kaiserschnitt gewonnene Tiere Mykoplasmenträger sein können. Verschiedene intrauterine Übertragungsmöglichkeiten werden diskutiert, wie

- a) bestehende Uterusinfektion bei der Konzeption,
- b) Besiedelung des Uterus nach der Konzeption,
- c) infizierte Eizellen und
- d) diaplazentare Übertragung.

Voraussetzung für die Infektion der Föten als Folge einer bestehenden Uterusinfektion zum Zeitpunkt der Konzeption ist, daß sich Mycoplasma pulmonis in der Uterusschleimhaut ansiedeln kann. Schon NELSON und GOWEN (1930) beobachteten Uterusläsionen, die gewöhnlich im Zusammenhang mit Mittelohrinfectionen und Pneumonien bei Ratten vorkamen.

GRAHAM (1963) konnte nachweisen, daß die vom Genitaltrakt isolierten Mykoplasmen mit dem Erreger der CRD identisch sind. Auch JUHR (1971) isolierte Mycoplasma pulmonis vom Uterus und

stellte fest, daß es nach stattgefundener Infektion zu einem lebenslangen Verbleiben der Erreger in diesem Organ kommt.

Über den Infektionsweg bestehen jedoch noch Meinungsverschiedenheiten. GRAHAM (1963) vermutet, daß sich Mykoplasmen während der embryonalen Entwicklung im Uterus und den Ovarien manifestieren. JUHR (1971) dagegen ist der Ansicht, daß es im Rahmen einer Septikämie dazu kommt.

FLYNN et al. (1968) untersuchten, ob weibliche Mäuse einer natürlich infizierten Population trotz eines durch *Mycoplasma pulmonis* infizierten Uterus konzipieren und austragen können. Von 430 Zuchtweibchen hatten 20% einen infizierten Uterus. Mit Ausnahme von 5 Tieren konzipierten alle und warfen lebensfähige Junge. Durch die Konzeption wurde die Infektionslage in keiner Weise verändert. In den meisten Fällen wurden in den Foeten bzw. Eihäuten Mykoplasmen nachgewiesen.

Zur Frage einer möglichen intrauterinen Infektion durch infizierte Eizellen ist zu sagen, daß Oophoritis, Salpingitis und Uterusinfektionen erfahrungsgemäß häufig zusammen auftreten. Eine Eiiinfektion ist daher nicht auszuschließen. Auch beim Geflügel ist die Übertragung von Mykoplasmen durch Eier wiederholt nachgewiesen worden. So isolierte JERSTAD (1949) von frischen Puteneiern Mykoplasmen und zog die Möglichkeit einer Übertragung durch Eier in Betracht. Durch MANTHONY (1953) wurde dieses Ergebnis bestätigt.

Eine weitere Infektionsmöglichkeit bietet die diaplazentare Übertragung, die von JUHR (1971) experimentell untersucht und bestätigt wurde. Keimfreie Wistar-Ratten waren intranasal durch $6 \times 0,5 \text{ ml}$ einer 10^6 KBE/ml enthaltenden Suspension infiziert und gleichzeitig gedeckt worden. Bei 5 untersuchten Tieren konnten vom 10. Trächtigkeitstag an aus Uterus und Plazenta, bei 4 Tieren aus den Eihäuten und bei 3 Tieren aus den Foeten Mykoplasmen isoliert werden.

Schließlich muß als letzte Möglichkeit noch eine Kontamination während der Manipulation am graviden Uterus bei der Sectio caesarea in Betracht gezogen werden.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Versuchstiere

Auf das natürliche Vorkommen von *Mycoplasma pulmonis* bei Ratten wurden 144 weibliche konventionelle Zuchtratten im Alter über 20 Tage und 90 konventionelle Jungtiere im Alter bis zu 3 Tagen untersucht.

Als Versuchstiere für experimentelle Infektionen dienten 56 keimfreie und 63 konventionelle, weiterhin als Kontrolltiere 15 keimfreie und 12 konventionelle WAG-Ratten im Alter von 90 - 100 Tagen, gezogen in der Zentralen Tierversuchsanlage der Universität Ulm. Um sie auf bestehende Mykoplasmen-Infektionen zu kontrollieren, wurde pro Versuchsanordnung ein Tier unter sterilen Bedingungen mit CO₂ getötet, seziiert und untersucht. Die Eingewöhnungszeit der Ratten betrug drei Tage. Anschließend wurden die keimfreien Tiere für zwei Tage gesetzt und danach infiziert. Bei den konventionellen Ratten wurde eine Unterteilung in zwei Gruppen durch die unterschiedliche Wahl des Inokulationszeitpunktes notwendig. Die erste Gruppe, welche die intrathorakale, intranasale, intravenöse und einen Teil der intraperitonealen Inokulationsform umfaßte, wurde nach der Eingewöhnungszeit für zwei Tage gesetzt und danach inokuliert. Die andere Gruppe, bestehend aus den intrauterin und einem Teil der intraperitoneal inokulierten Tiere wurde nach der Eingewöhnungszeit sofort infiziert und nach Ablauf von weiteren 15 Tagen gesetzt.

Die Haltung der keimfreien Tiere erfolgte in Trexler-Typ Plastic - Isolatoren, in Makrolonkäfigen, bei einer Temperatur von 21 °C und relativer Luftfeuchtigkeit von 55 - 60%. Weichholz-Granulat diente als Einstreu, autoklavierte Pellet-Diät Altromin 1115 und autoklaviertes Aqua dest. standen ad libitum zur Verfügung.

Der Hell-Dunkelrhythmus betrug 12 - 12 Std.

Die Desinfektion der Isolatoren wurde mit 2 %iger Peressigsäure vorgenommen. Zum Nachweis der Keimfreiheit wurde das Waschwasser sowohl auf Bakterien als auch auf Mykoplasmen untersucht.

Für die konventionellen Tiere galten bis auf die Isolatoren die gleichen Bedingungen.

3.1.2. Züchtung von Mykoplasmen

a) Nährböden

Folgende Nährböden wurden für die Kultivierung von Mykoplasmen verwendet:

aa) Feste Form mit Hemmstoffen

Difco PPLO-Agar	70
Pferdeserum	20
Hefeextrakt	10
Penicillin G (100.000 I.E./ml)	1
Thalliumsulfat (2,5%)	1

ab) Feste Form ohne Hemmstoffe

Mit Ausnahme der Hemmstoffe wie aa)

ac) Flüssige Form mit Hemmstoffen

Wie aa) nur anstelle von Difco-PPLO-Agar, Difco PPLO-Broth.

ad) Flüssige Form ohne Hemmstoffe

Wie ab) nur ohne Hemmstoffe

Für alle Nährböden wurde der Hefeextrakt in eigener Regie nach dem Verfahren von HERS hergestellt (Lemcke, R.M. 1965).

Auf 100 ml Aqua dest kamen 100 g frische Bäckerhefe. Das Ganze wurde auf einen pH von 4,5 eingestellt, 30 Min. im Wasserbad auf 80 °C erhitzt und anschließend bei 2000 r.p.m. 20 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde sodann dekantiert und der pH auf 7,4 eingestellt. Die Sterilisation erfolgte durch Seitz - Filter EKS II.

Das Filtrat wurde in 15 ml Portionen abgefüllt und bei -25 bis -30 °C aufbewahrt.

b) Reinzüchtung

Die Züchtung der Mykoplasmen eines Stammes von *Mycoplasma pulmonis* für die Infektion aus dem Respirationstrakt konventioneller WAG-Ratten erfolgte in Reagenzgläsern und auf PPLO-Agarplatten. Inkubiert wurde bei 37 °C unter aeroben Bedingungen, bei einem pH von 7,4. Eine Kontrolle auf Koloniewachstum erfolgte sowohl in der Bouillon, als auch auf den Platten ab dem 4. Inkubationstag im Rhythmus von 3 Tagen mit einem Stereo-Mikroskop Fa. Leitz und erstreckte sich über einen Zeitraum von drei Wochen. Weiterhin wurde im Abstand von drei Tagen jeweils eine Bouillon-Probe auf PPLO-Agar-Platten überimpft.

Nach gelungener Mykoplasmen-Isolierung wurde aus den positiven PPLO-Agarplatten eine Kolonie ausgestantzt, in 0,5 ml PPLO-Bouillon suspendiert und nach einer Inkubationszeit von drei Tagen in 10-er Potenzen bis 10^{-15} in PPLO-Bouillon verdünnt. Von jeder Verdünnung wurden nach einer Inkubationszeit von drei Tagen mit der Öse jeweils zwei PPLO-Agarplatten überimpft.

Eine einzelne Kolonie wurde von derjenigen Agarplatte isoliert und in 0,5 ml Bouillon resuspendiert, welche von der letzten positiven Verdünnung hergestellt worden war. Nach zwei weiteren Klonierungen wurden die Mykoplasmen dann mit Hilfe des

Wachstumshemmungstestes nach CLYDE (1964) differenziert. Als Testserum diente "Mycoplasma pulmonis Hyperimmune-Rabbit-Serum for growth inhibition" der Fa. Microbiological Associates INC. Bethesda, California , USA .

c) Vermehrung von Mycoplasma pulmonis zwecks späterer Inokulation

Als Wachstumsmedien für die Mycoplasma pulmonis - Vermehrung dienten entweder PPLO-Bouillon oder PPLO-Agarplatten. Im ersten Falle wurden nach einer Inkubationszeit von 3 - 4 Tagen die Bouillonkulturen bei 6000 r.p.m. eine halbe Stunde zentrifugiert, anschließend die Hälfte der Gesamtlösung dekantiert, das Sediment in der verbleibenden Bouillon aufgeschüttelt und einige Tropfen davon als bakteriologische Kontrolle auf Blut-Agar, Brain-Heart- und Thioglykolat-Bouillon angelegt.

Für die Titerbestimmung wurde eine Verdünnungsreihe in physiologischer NaCl bis 10^{10} hergestellt und von jeder Verdünnungsstufe jeweils 0,01 ml auf eine PPLO-Platte gegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 4 Tagen wurden die schwachbewachsenen Platten ausgezählt und die Titer pro ml bestimmt.

Die auf den Agarplatten angezüchteten Kolonien wurden entweder mit physiologischer NaCl abgespült und nach dem oben angeführten Verfahren weiter behandelt, oder mit dem Agar homogenisiert.

3.1.3. Untersuchungsgang

a) Infektion der Tiere

Zur Infektion wurde der nach 3.1.2. b) und c) isolierte und vermehrte Stamm von *Mycoplasma pulmonis* benützt.

Als Applikationsform dienten neben der bewährten intranasalen, (JUHR 1971) und intraperitonealen (SCHÜTZE 1968) Infektion auch die weniger bevorzugte intrathorakale, intravenöse und intrauterine Form.

Die Infizierung der Versuchstiere erfolgte

aa) durch Mykoplasmen-Suspension in physiol.

NaCl - Lösung

ab) durch Mykoplasmen-Suspension in PPLO-Broth

ac) durch homogenisierte Mykoplasmen-Agarkulturen.

PPLO-Broth und Agar dienten als Infektionsgleitschienen (SCHÜTZE 1968).

Die Inokulationsmenge variierte bei den einzelnen Versuchen zwischen 0,2 und 2,0 ml pro Dosis und die Anzahl der KBE/ml zwischen $0,25 \times 10^6$ und $36,3 \times 10^6$. Nähere Angaben sind aus den Tabellen 1 und 2 zu entnehmen.

Die in Reinkultur vorliegenden Mykoplasmen wurden zum Zwecke der Inokulation in 1 ml Einmalspritzen in die Isolatoren eingeschleust. Um die Einwirkung der 2%igen Peressigsäure auf die Mykoplasmen auszuschließen, wurde das Aufziehen der Einmalspritzen in der sterilen Verpackung vorgenommen und die dadurch notwendig gewordene Perforation der Plastikhülle nach dem Vorgang durch Verkleben geschlossen.

Für die Dauer der Inokulation wurden die Tiere durch Thiogenal immobilisiert. Kontrolltiere erhielten nur das mykoplasmenfreie Grundsubstrat in entsprechender Form und Menge.

Tab. 1

Infektionsmodus bei keimfreien Ratten

Art	Zahl der Tiere	Dosis ml	Erregermenge KBE/ml
intrathorakal	6	1,5	$12,60 \times 10^6$
	3	2,0	$19,41 \times 10^6$
	5	2,0	$21,61 \times 10^6$
intranasal	11	0,5	$0,90 \times 10^6$
	7	1,0	$1,20 \times 10^6$
intravenös	5	0,5	$6,00 \times 10^6$
	7	1,0	$15,30 \times 10^6$
intraperitoneal	3	0,5	$6,00 \times 10^6$
	5	2,0	$2,60 \times 10^6$

Tab. 2

Infektionsmodus bei konventionellen Ratten

Art	Zahl der Tiere	Dosis ml	Erregermenge KBE/ml
intrathorakal	3	0,5	$1,34 \times 10^6$
	3	1,0	$2,44 \times 10^6$
	9	2,0	$20,00 \times 10^6$
intraperitoneal	3	0,5	$0,70 \times 10^6$
	9	1,0	$1,22 \times 10^6$
intravenös	9	0,5	$0,70 \times 10^6$
intrauterin	9	0,5	$0,70 \times 10^6$
intrathorakal + intravenös	16	3,0	$36,30 \times 10^6$

b) Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Folgende Organe und Organteile wurden von den graviden Ratten für Untersuchung von *Mycoplasma pulmonis* gewonnen:

1. Nasenschleimhaut, Kehlkopf, Lunge
2. Leber, Milz
3. Ovarien, Endometrium
4. Plazenta, Foeten

Auf Grund der unterschiedlichen Zeitspannen, in der die Tiere post inokulationem getötet wurden, können sie in 3 Gruppen eingeteilt werden:

Gruppe (1) umfaßt die am 15. Tage nach dem Setzen getöteten Ratten. Hier sind einzuordnen 5 konventionelle, 2 keimfreie intraperitoneal und 2 keimfreie intrathorakal infizierte Tiere.

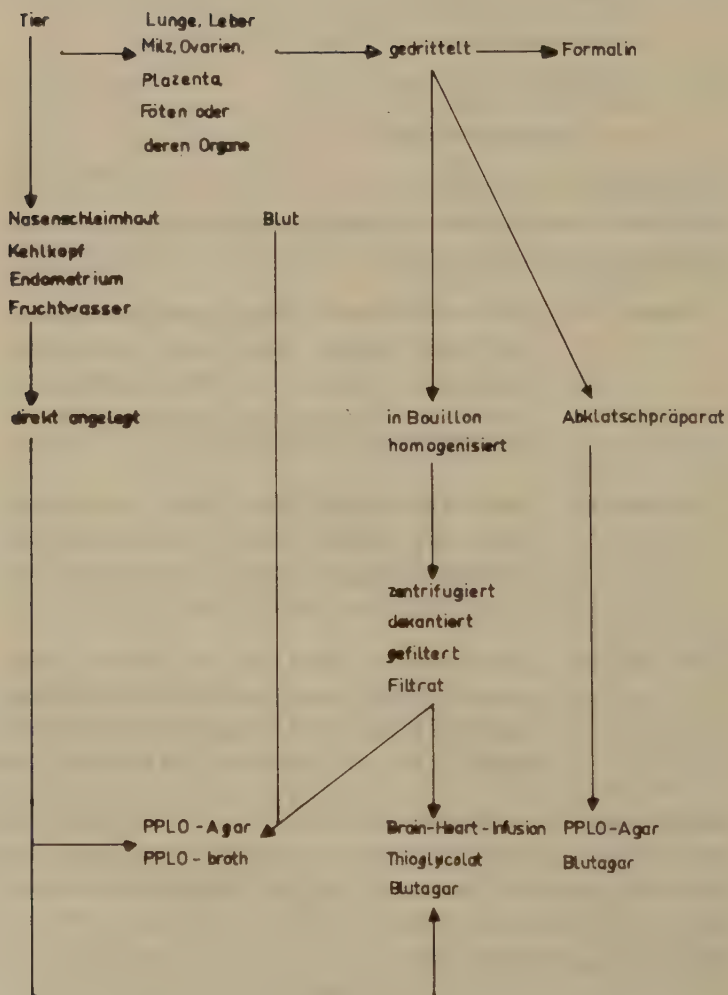
Gruppe (2) umfaßt die am 60. Tage nach dem Setzen getöteten Ratten. Hier sind einzuordnen 3 intraperitoneal und 9 intrauterin infizierte konventionelle Tiere.

Gruppe (3) umfaßt die am Ende der Gravidität getöteten Ratten. Hier sind alle diejenigen inokulierten Tiere einzuordnen, welche in Gruppe (1) und (2) nicht aufgeführt sind.

Die Tötung erfolgte durch Aether in den Isolatoren. Unmittelbar danach wurden die Tiere ausgeschleust, Blut aus der Vena cava caudalis gewonnen und zur Kontrolle auf PPLO-Nährmedien ausgestrichen. Anschließend kamen die Tiere in eine 1,2%ige Lorasol-Lösung.

Abb. 1

Gewinnung und Bearbeitung des Untersuchungsmaterials



Hier wurden sie auf Silikonplatten fixiert, anschließend das Fell abpräpariert und mit sterilen Instrumenten die Bauchhöhle geöffnet. Mit einem weiteren sterilen Instrumenten-Set wurde dann der Uterus präpariert. Dabei wurde nach folgendem Schema vorgegangen:

Mit jeweils einer Arterienklemme wurden Cervix-uteri und die beiden Tuben fixiert, mit einer Schere durchtrennt und vom Ligamentum latum freipräpariert. Uterus und Tuben wurden dann in steriler physiologischer NaCl gespült und auf steriler Unterlage in eine UV-Box gebracht. Dort wurde der Uterus an der lateralen Seite geöffnet, ohne die Eihäute zu perforieren. Föten mit intakten Eihäuten einschließlich Plazenta wurden herauspräpariert, in eine 1,2%ige Lorasol^(R)-Lösung für mindestens 2 Min. gegeben und anschließend in Aqua dest gespült. Nach dem Trocknen auf sterilen Einmaltüchern wurde Fruchtwasser gewonnen, anschließend die Plazenta von den Eihäuten getrennt und die Foeten entwickelt.

c) Bearbeitung des Untersuchungsmaterials

Plazenten, Ovarien, Milzen, Teile der Lebern und die isolierten Föten kamen im Anschluß an die Sektion für zwei Minuten in eine 2%ige Lorasol-Lösung (R), wurden danach in Aqua dest. gespült und auf sterilen Einmaltüchern getrocknet. Alle Organe wurden im Anschluß daran in 3 Portionen aufgeteilt. Der 1. Teil diente zur Herstellung von Abklatschpräparaten auf PPLO-Nährböden und Blutplatten, der 2. Teil wurde in Formalin fixiert und der dritte Teil zum kulturellen Mykoplasmen-Nachweis zerkleinert. Von Föten, die am Ende der Gravidität entwickelt worden waren, wurden Lunge, Leber und Milz getrennt gewonnen und untersucht. Die am 15. Graviditätstag entwickelten Föten wurden dagegen in Höhe des Diaphragmas halbiert und nach Zerkleinerung insgesamt untersucht.

Abb. 1 zeigt schematisch den Ablauf des gesamten Untersuchungsganges.

Der weitere Arbeitsgang bestand in einem Verfahren, das von mir im Rahmen dieser Arbeit speziell für die Mykoplasmen-diagnostik entwickelt wurde, um bakterielle Verunreinigungen auszuschalten:

Die mit sterilem Quarzsand im Mörser homogenisierten Organteile wurden in Bouillon suspendiert, anschließend bei 6.000 r.p.m. 10 Min. zentrifugiert, der Überstand abpipetiert und anschließend filtriert. Als Filter kamen Sartorius Zellulosenitrat Membranfilter zur Verwendung mit einem Durchmesser von 25 mm und einem Porendurchmesser von 1,2, 0,6 und 0,45 μm . Dabei wurde vorausgesetzt, daß die Größe der kleinsten vermehrungsfähigen Einheiten zwischen 100 - 700 nm liegen.

Die Anordnung der Filter erfolgte in Form einer Säule.

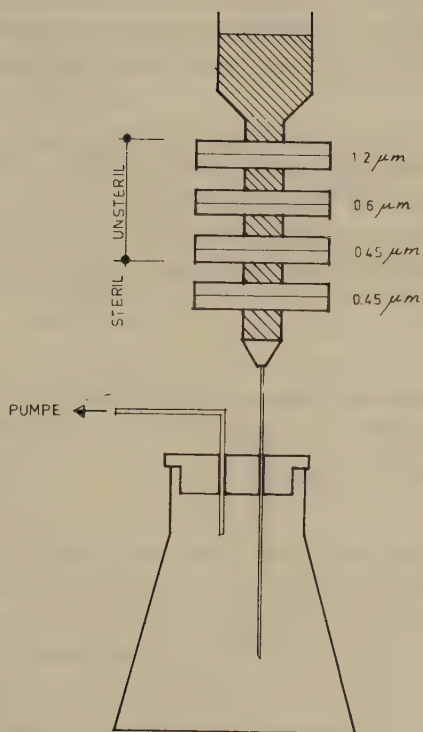
Siehe Abb. 2

Bei dem Aufbau der Filtersäule wurden einem sterilen 0,45 μm Filter ein 1,2, ein 0,6 und ein 0,45 μm Filter vorgeschaltet. Dabei diente der unsterile 0,45 μm Filter als Vorfilter, um ein vorzeitiges Verstopfen des sterilen Filters zu verhindern. Die Filter wurden je nach Beschaffenheit des Filtermantels entweder durch Autoklavieren oder Begasen mit Äthylenoxyd sterilisiert.

d) Untersuchung auf Mycoplasma pulmonis und Begleitbakterien

Von allen unter Punkt c) angeführten Organen wurde von der Schnittfläche jeweils ein Abklatschpräparat auf PPLO- und auf Blutagar hergestellt und das mit Hilfe der Filtersäule gewonnene Filtrat nach folgendem Schema angelegt:

- 0,1 ml Filtrat auf PPLO-Agar
- 0,1 ml Filtrat auf Blutagar
- 2,0 ml Filtrat in PPLO-Bouillon
- 0,1 ml Filtrat in Brain-Heart-Infusion
- 0,1 ml Filtrat in Thioglycolat-Bouillon



Die beimpften Nährmedien wurden unter aeroben Bedingungen bei 37°C und 75% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Die erste Untersuchung der Platten auf ein positives Wachstum wurde nach einer Bebrütungszeit von 4 Tagen vorgenommen und bei negativem Ausfall weiterer Kontrollen im Rhythmus von 3 Tagen bis zu maximal 3 Wochen durchgeführt.

Wenn nach 7 Tagen auf den Platten noch kein Mykoplasmenwachstum zu beobachten war, wurden Subkulturen in PPLO-Bouillon angelegt und diese nach weiteren 4 Tagen auf Agar rekultiviert.

In PPLO-Bouillon wurde das Mykoplasmenwachstum durch mehrmaliges Überimpfen auf PPLO-Agar in 4-tägigen Abständen kontrolliert. Die Beobachtung erstreckte sich über einen Zeitraum von drei Wochen. Bei positivem Wachstum wurde mit Hilfe des Wachstumshemmungstestes eine Differenzierung vorgenommen.

3.2. Untersuchungsergebnisse

3.2.1. Untersuchungen über das natürliche Vorkommen von *Mycoplasma pulmonis* bei Ratten.

Um die Häufigkeit einer eventuellen intrauterinen Übertragung unter natürlichen Bedingungen festzustellen, wurde zunächst der Befall von Muttertieren und die Kontamination neugeborener Ratten mit *Mycoplasma pulmonis* im konventionellen Zuchtbestand untersucht.

Da sich die Mykoplasmen bei der natürlichen Infektion zunächst in den oberen Teilen des Respirationstraktes ansiedeln, wurde der Befall des Nasen-Rachenraums als Hauptkriterium für eine vorhandene Infektion angesehen. Weiterhin wurden getrennt untersucht die Lungen, die Vagina und das Endometrium. Dadurch sollte geprüft werden, ob eine Beziehung in der Kontaminationsrate zwischen Respirations- und Genitaltrakt besteht, die Rückschlüsse auf das Zustandekommen von Uteruskontaminationen bzw. der Übertragung auf Embryonen oder Föten erlaubt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. 3 zusammengestellt.

Von 144 untersuchten weiblichen konventionellen Zuchtratten im Alter über 20 Tage waren im Nasen-Rachenraum 117 Tiere = 81,2%, in der Lunge 60 Tiere = 41,6% und im Endometrium 14 Tiere = 9,7% mykoplasmenpositiv.

Von 90 konventionellen Jungtieren im Alter bis zu 3 Tagen aus den gleichen Beständen, aus 45 Würfen, konnten keine Mykoplasmen isoliert werden.

Als zweite Tiergruppe wurden Tiere aus dem keimfreien Zuchtbestand im Alter über 20 Tage auf Mykoplasmen im Respirations- und Genitaltrakt untersucht. Darunter befanden sich auch 4 Tie-

Tab. 3 Vorkommen von Mycoplasma pulmonis bei konventionellen Ratten
(x = nicht untersucht)

Herkunft Alter Geschlecht	Untersuchte Tiere	Mykoplasmen - Nachweis positiv			
		Nas.-Rachenraum	Lunge	Genitaltrakt	Uterus Vagina
Konventioneller Zuchtbestand, über 20 Tage alte ♀	144	117 (= 81,2 %)	60 (=41,6%)	14 (=9,7 %)	43 (=26,8 %)
Konventioneller Zuchtbestand bis 3 Tage alte ♂ + ♀	90	0	0	x	x
Keimfreier Zucht- bestand, über 20 Tage alt, ♀	61	0	0	0	0

re, die durch Sectio von konventionellen Müttern gewonnen und von keimfreien Ammen aufgezogen worden waren.

Bei allen 61 keimfreien Tieren blieb der Nachweis auf Mykoplasmen negativ.

3.2.2. Untersuchungen an experimentell infizierten, trächtigen, keimfreien Ratten

Die Untersuchungsbefunde der intranasal, intravenös, intraperitoneal oder intrathorakal infizierten Ratten sind in den Tab. 4 - 7 zusammengestellt. Von den ursprünglich in Versuch genommenen 56 weiblichen, keimfreien Tieren schieden 4 Tiere vor Versuchsende aus.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

Bei den intranasal inokulierten Tieren (Tab. 4) entstanden innerhalb von 4 - 6 Tagen klinische Anzeichen einer Pneumonie. Alle 18 Ratten wurden trächtig. Die Sektion der am 20. Graviditätstag getöteten Tiere ergab pathologisch anatomische Veränderungen der Lunge.

Mycoplasma pulmonis konnte nur aus Lungen und dem oberen Respirationstraktus der Muttertiere zurückisoliert werden. Alle Föten waren mykoplasmenfrei.

Die bakteriologische Kontrolle war negativ. Bei den Kontrolltieren bestanden keine pathologisch anatomischen Veränderungen. Mykoplasmen konnten nicht nachgewiesen werden.

Bei den intravenös infizierten Tieren (Tab. 5) bestanden keine klinischen Anzeichen einer Erkrankung. Alle Tiere wurden trächtig. Die Sektion ergab keine pathologisch-anatomischen Veränderungen bei den am 20. Graviditätstag getöteten Tieren.

Mykoplasmen konnten sowohl von den Muttertieren als auch von den Föten nicht zurückisoliert werden.

Die bakteriologischen Kontrollen waren negativ. Bei den Kontrolltieren bestanden keine pathologisch anatomischen Veränderungen. Mykoplasmen konnten nicht nachgewiesen werden.

Alle intraperitoneal infizierten Tiere (Tab. 6) zeigten am zweiten Tag nach der Infektion bereits klinische Anzeichen einer leichten Allgemeinerkrankung, deren Symptome verschiedenen

lang bestanden, sie wurden alle trächtig.

Drei Tiere wurden am 15. Graviditätstag getötet. Bei ihnen bestanden pathologisch-anatomische Veränderungen in Form einer Peritonitis mit geringgradigen Auflagerungen und großflächigen Verklebungen der abdominalen Organe. Weiterhin wurden Placentitiden mit partiellen Plazentaablösungen festgestellt.

Fünf Tiere wurden am 20. Graviditätstag getötet. Pathologisch-anatomisch lagen die gleichen Veränderungen vor. Bei einem Tier kam es am 18. Tag der Gravidität zu einem vollständigen Abortus, während zwei Tiere am 17. und am 19. Tag unvollständig abortierten. Dabei war nur jeweils das der Injektionsstelle am nächsten liegende Uterushorn betroffen.

Mycoplasma pulmonis konnte vom Endometrium, von den Außenflächen der Plazenten und den serösen Überzügen der Bauchorgane zurückisoliert werden.

Alle Föten einschließlich der abortierten waren mykoplasmenfrei. Die bakteriologischen Kontrollen waren negativ.

Bei den Kontrolltieren bestanden keine pathologisch-anatomischen Veränderungen. Mykoplasmen konnten nicht nachgewiesen werden.

Bei der intrathorakalen Inokulation (Tab. 7) bestanden vom ersten Tag post inokulationem an klinische Erscheinungen einer Erkrankung des Respirationstraktes. Von 14 gesetzten Tieren wurden 13 trächtig.

Bei der Sektion wurden ausgedehnte pathologisch-anatomische Veränderungen festgestellt. Sie bestanden in fibrinösen Pleuraauflagerungen, teilweiser oder ganzer Ausfüllung des Mediastinums durch Fibrin, partieller oder vollständiger „Blockierung“ eines Lungenflügels durch Fibrinmassen. Auch s.c., an der Injektionsstelle, konnten Einlagerungen festgestellt werden.

Bei einem von zwei am 15. Graviditätstag getöteten Tieren bestanden partielle Platzentaablösungen.

Mycoplasma pulmonis konnte bei allen Tieren vom Endometrium, von den Außenflächen der Plazenten, aus den Lungen, von den oberen Respirationstrakten, den thorakalen fibrinösen Auf- und Einlagerungen und aus den subcutanen Umfangsvermehrungen zurückisoliert werden. Weiterhin konnten von den Plazenten-Schnittflächen zweier Tiere *Mycoplasma pulmonis* nachgewiesen werden. Außer den Föten von zwei Muttertieren waren alle *Mycoplasma-pulmonis* positiv.

Die bakteriologischen Proben waren negativ.

Bei den Kontrolltieren bestanden keine pathologisch-anatomischen Veränderungen. Mykoplasmen konnten nicht nachgewiesen werden.

Tab. 4 Intrauterine Übertragung, nach intrasasaler Infektion keimfreier Ratten mit

Mycoplasma pulmonis, suspendiert in NaCl-Lösung

Tier Nr.	Inokulations- dosis	Trächtig- keit	Mykoplasmennachweis bei Muttertieren			Mykoplasmennachweis bei Föten						
			O r g a n e			O r g a n e						
			Ut. Pl.	Ova.	Lung.	Leb.	Milz	Blut	Frucht- wasser	Lung.	Leb.	Milz
1	0,8 x 10 ⁶	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
2	"	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
3	"	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
4	"	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
5	"	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
6	"	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
7	"	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
8	"	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
9	"	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
10	"	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
11	"	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
12	1,2 x 10 ⁶	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
13	"	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
14	"	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
15	"	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
16	"	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
17	"	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
18	"	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Tab. 5

Intrauterine Übertragung, nach intravenöser Infektion keimfreier Ratten mit

Mycoplasma pulmonis, suspendiert in physiologischer NaCl - Lösung

Tier	Inokulations- dosis	Trächtig keit	Mykoplasmenachweis bei Muttertieren			Mykoplasmenachweis bei Föten				
			O r g a n e			O r g a n e				
			Ut.	Pl.	Ova.	Lung.	Leb.	Milz		
							Frucht- wasser	Lung.	Leb.	Milz
1	0,6 x 10 ⁶	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	"	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	"	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4	"	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	"	+	-	-	-	-	-	-	-	-
6	15,3 x 10 ⁶	+	-	-	-	-	-	-	-	-
7	"	+	-	-	-	-	-	-	-	-
8	"	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9	"	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10	"	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11	"	+	-	-	-	-	-	-	-	-
12	"	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 6 Intrauterine Übertragung, nach intraperitonealer Infektion keimfreier Ratten
mit Mycoplasma pulmonis, suspendiert in Bouillon

Tier	Inokulations- dosis	Trächtig- keit	Mykoplasmennachweis bei Muttertieren				Mykoplasmennachweis bei Föten			
			O r g a n e				O r g a n e			
			Ut. Pl.	Ova.	Lung.	Leb.	Milz	Blut Frucht- wasser	Lung.	Leb. Milz
1	0,6 x 10 ⁶	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	"	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	"	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4	2,6 x 10 ⁶	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	"	+	-	-	-	-	-	-	-	-
6	"	+	-	-	-	-	-	-	-	-
7	"	+	-	-	-	-	-	-	-	-
8	"	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 7 Intrauterine Übertragung, nach intratorakaler Infektion keimfreier Ratten mit
Mycoplasma pulmonis, suspendiert in Bouillon

Inokulations- dosis	Trächtig- keit	Mykoplasmennachweis bei Muttertieren				Mykoplasmennachweis bei Föten			
		Ut. Pl.	Ova.	Lung. Leb.	Milz Blut	Frucht- wasser	Lung.	Leb. Milz	Organe
Organe									
1	$12,9 \times 10^6$	+	-	+	-	-	+	-	-
2	"	+	-	+	-	-	+	+	+
3	"	-	-	+	-	-	-	-	-
4	"	+	-	+	-	-	+	+	+
5	"	+	-	+	-	-	+	+	+
6	"	+	-	+	-	-	-	-	-
7	$19,41 \times 10^6$	+	-	+	-	-	+	-	-
8	"	+	-	+	-	-	-	-	-
9	"	+	-	+	-	-	+	+	+
10	$21,61 \times 10^6$	+	-	+	-	-	+	-	-
11	"	+	+	+	-	-	+	+	+
12	"	+	+	+	-	-	+	+	+
13	"	+	-	+	-	-	+	+	+
14	"	+	-	+	-	-	+	+	+

3.2.3. Untersuchungen an experimentell infizierten, trächtigen, konventionellen Ratten

Die Untersuchungsergebnisse bei den auf unterschiedlichen Wegen infizierten Tiergruppen sind in der Tabelle 8 - 12 zusammengestellt.

Durch die intravenöse Inokulation (Tab. 8) konnten keine klinischen Anzeichen einer Erkrankung hervorgerufen werden. Alle Tiere wurden trächtig.

Die Sektion, durchgeführt am Ende der Gravidität, ergab keine pathologisch-anatomischen Veränderungen.

Mykoplasmen konnten sowohl von den Muttertieren, als auch von den Föten nicht zurückisoliert werden.

Die bakteriologischen Kontrollen waren negativ.

Bei den Kontrolltieren bestanden keine pathologisch-anatomischen Veränderungen. Mykoplasmen konnten nicht nachgewiesen werden.

Bei den intraperitoneal inokulierten Tieren (Tab. 9) wurden 3 Tiere (Nr. 1 - 3) 15 Tage post inokulationem gesetzt. Diese Tiere zeigten nach der Infektion zwar keine klinischen Anzeichen einer Erkrankung, sie wurden aber nicht trächtig.

Bei der 2 Monate nach dem Setzen vorgenommenen Sektion zeigten alle Ratten die Ausbildung beidseitiger ovarieller Zysten, deren Durchmesser zwischen 1,5 - 2,5 cm variierte. Der Zysteninhalt bestand in den meisten Fällen aus einer gelblich klaren Flüssigkeit, welcher in einigen Fällen auch Blut beige-mischt war. In allen Fällen war das Parenchym eitrig eingeschmolzen.

Mycoplasma pulmonis konnte bei allen Tieren vom Endometrium, aus dem grünlich-gelben Eiter der Ovarien und von der Oberfläche der abdominalen Organe in großer Koloniedichte zurückisoliert werden. Bakteriologische Untersuchungen der Ovarien und der Zystenflüssigkeiten blieben negativ. Bei

den Kontrolltieren bestanden keine pathologisch-anatomischen Veränderungen. Mykoplasmen konnten nicht nachgewiesen werden.

Insgesamt 9 Ratten (Nr. 4 - 13) wurden für 2 Tage gesetzt und unmittelbar darauf intraperitoneal infiziert. Alle diese Tiere wurden trächtig. Bei drei Ratten kam es aber am Ende der Gravidität zu Aborten.

Zur Sektion kamen am 15. Tag der Trächtigkeit 4 Tiere (Nr. 4 - 8). Zu diesem Zeitpunkt bestanden pathologisch-anatomische Veränderungen in Form einer Peritonitis mit geringgradigen Auflagerungen und großflächigen Verklebungen der abdominalen Organe. Bei allen vier Tieren hatten sich die Plazenten in der peripheren Zone vollständig gelöst. Diese Bezirke waren mit einem graugelben Überzug versehen.

Die verbleibenden Tiere (Nr. 9 - 13) wurden am Ende der Gravidität getötet und sezziert. Die pathologisch-anatomischen Veränderungen entsprachen denjenigen der am 15. Tage getöteten Tiere, nur bestand noch teilweise Verbindung der Plazenten mit dem Endometrium im zentralen Bereich.

Mycoplasma pulmonis konnte vom Endometrium, von der Oberfläche aller Plazenten und den serösen Überzügen aller abdominalen Organe in großer Koloniedichte zurückisoliert werden. Auch das Fruchtwasser eines Tieres war Mycoplasma pulmonis positiv. Alle Föten, einschließlich der abortierten, waren mykoplasmenfrei.

Bakteriologische Untersuchungen blieben negativ. Bei den Kontrolltieren bestanden Peritonitiden. Mykoplasmen konnten nicht nachgewiesen werden.

Die intrauterin inokulierten Tiere (Tab. 10) wurden 15 Tage post inokulationem gesetzt. Zu einer Trächtigkeit kam es bei diesen 9 Tieren im Verlauf weiterer 30 Tage nicht.

Die Sektion wurde 2 Monate nach der Inokulation bei allen Tieren durchgeführt. An den Ovarien aller Tiere befanden sich Zysten, deren Durchmesser zwischen 0,3 - 2,5 cm variierte. Bei sechs Tieren war stets nur jenes Ovar makroskopisch in Mitleidenschaft gezogen, welches sich auf der inokulierten Seite befand, während bei drei Tieren beidseitige Veränderungen vorlagen. Auch hier bestanden die umfangreichsten Veränderungen stets auf der inokulierten Seite.

In allen Fällen der Zystenbildung war das Parenchym eitrig eingeschmolzen. Der Zysteninhalte bestand bei sieben Tieren aus einer gelblich-klaaren Flüssigkeit, in drei Fällen war ihm auch Blut beigemischt.

Mycoplasma pulmonis konnte bei allen Tieren vom Endometrium aus dem grün-gelblichen Eiter der Ovarien und von der Oberfläche der abdominalen Organe in großer Koloniedichte zurückisoliert werden. Der Inhalt der Zysten war mykoplasmenfrei.

Bakteriologische Untersuchungen der Ovarien und der Zysteninhalte blieben negativ.

Die Kontrolltiere wurden alle trächtig, pathologisch-anatomische Veränderungen bestanden nicht und Mykoplasmen konnten nicht nachgewiesen werden.

Die intrathorakal inokulierten Tiere (Tab. 11) wurden auf Grund ihrer unterschiedlichen Inokulationsgrundlage in drei Gruppen eingeteilt.

- a) Mykoplasmasuspensionen in physiologischer NaCl-Lösung (Tiere 1 - 4) führten nicht zu klinischen Anzeichen einer Erkrankung. Alle Tiere wurden trächtig. Bei der Sektion lagen keine pathologisch-anatomischen Veränderungen vor.

Mycoplasma pulmonis konnte von den Lungen und dem oberen Respirationstrakt zurückisoliert werden. Die Föten waren stets mykoplasmenfrei.

Die bakteriologischen Untersuchungen blieben negativ.

Bei den Kontrolltieren bestanden keine pathologisch-anatomischen Veränderungen. Mykoplasmen konnten nicht nachgewiesen werden.

- b) In Bouillon suspendierte Mykoplasmen führten bei 3 infizierten Tieren einen Tag post inokulationem zu einer Erkrankung des Respirationstraktes. Alle Ratten wurden trächtig.

Bei der Sektion wurden ausgedehnte pathologisch-anatomische Veränderungen festgestellt. Sie bestanden in fibrinösen Pleuraauflagerungen der kontaminierten Thoraxhälfte, teilweiser oder ganzer Ausfüllung des Mediastinums durch Fibrin, partieller oder vollständiger Blockierung eines Lungenflügels durch Fibrinmassen und in der Subkutis liegende Umfangsvermehrungen im Bereich der Injektionsstellen.

Mycoplasma pulmonis konnte vom Endometrium, von der Obeifläche aller Plazenten, aus den Lungen, von den oberen Respirationstrakten, den thorakalen Fibrinein- und -auflagerungen, den s.c. Umfangsvermehrungen aller Tiere und aus dem Fruchtwasser eines Tieres nachgewiesen werden. Zwei der 3 Föten erwiesen sich als *Mykoplasma pulmonis* positiv.

Die bakteriologischen Untersuchungen des Endometriums, der Plazenten, des Fruchtwassers, der Föten und der Fibrinein- und -auflagerungen blieben negativ.

Bei den nur mit Bouillon inokulierten Kontrolltieren bestanden die gleichen pathologisch anatomischen Veränderungen im Bereich des Thorax wie nach Infektion mit mykoplasmenhaltiger Bouillon. Mykoplasmen konnten jedoch sowohl von den Muttertieren als auch von den Föten nicht nachgewiesen werden.

- c) Die Infektion der Mykoplasmen in einem Agar-Bouillonemisch führte einen Tag nach der Inokulation bei allen Tieren zu einer Erkrankung des Respirationstraktes. Alle 9 Ratten wurden trächtig.

Bei der Sektion bestanden die gleichen Veränderungen wie sie unter b) aufgeführt sind.

Mycoplasma pulmonis konnte vom Endometrium von der Oberfläche aller Plazenten, aus den Lungen, von den oberen Respirationstrakten, den thorakalen fibrinösen Auf- und Einlagerungen und von den subkutanen Umfangsvermehrungen aller Tiere zurückisoliert werden. Weiterhin gelang der Mycoplasma pulmonis-Nachweis aus der Milz bei drei Tieren und aus der Plazenta eines Tieres.

In den Föten aller Ratten konnte Mycoplasma pulmonis nachgewiesen werden.

Die bakteriologischen Untersuchungen des Endometriums, der Plazenten, des Fruchtwassers, der Föten und der Fibrinein- und -auflagerungen blieben negativ.

Auch hier bestanden bei den Kontrolltieren, die mykoplasmenfreies Agar-Buillonemisch erhalten hatten, pathologisch-anatomische Veränderungen im Bereich des Thorax, wie sie unter b) angegeben sind. Mykoplasmen konnten nicht nachgewiesen werden.

Bei den kombiniert intrathorakal und intravenös inokulierten Tieren (Tab. 12) bestanden am ersten Tag nach der Inokulation klinische Erscheinungen einer Erkrankung des Respirationstraktes. Alle Tiere wurden trächtig.

Die Sektion ergab ausgedehnte pathologisch-anatomische Veränderungen. Sie bestanden in fibrinösen Pleuraauflagerungen der kontaminierten Thoraxhälfte, teilweiser oder ganzer Ausfüllung des Mediastinums durch Fibrin, partieller oder vollständiger „Blockierung“ eines Lungenflügels durch Fibrinmassen

und s.c. Umfangsvermehrungen im Bereich der Injektionsstellen.

Mycoplasma pulmonis konnte vom Endometrium, von den Außenflächen der Plazenten, aus den Lungen, dem oberen Respirationstrakt und aus den thorakalen, fibrinösen Auf- und Einlagerungen aller Tiere zurückisoliert werden. Weiterhin war die Plazenta einer Ratte positiv.

In den untersuchten Föten konnten in 15 von 16 Fällen Mykoplasmen nachgewiesen werden.

Die bakteriologischen Untersuchungen des Endometriums, der Plazenten, des Fruchtwassers, der Föten und der fibrinösen Ein- und Auflagerungen blieben negativ.

Bei den Kontrolltieren bestanden pathologisch-anatomische Veränderungen im Bereich des Thorax wie sie unter b) angegeben sind.

Mykoplasmen konnten sowohl von den Muttertieren, als auch von den Föten nicht nachgewiesen werden.

Tab. 8 Intrauterine Übertragung, nach intravenöser Infektion konventioneller Ratten mit
Mycoplasma pulmonis, suspendiert in physiologischer NaCl

Tier Nr.	Inokulations- dosis	Trächtig- keit	Mykoplasmennachweis bei Muttertieren				Mykoplasmennachweis bei Föten						
			O r g a n e				O r g a n e						
			Ut.	Pl.	Ova.	Lung.	Leb.	Milz	Blut	Frucht- wasser	Lung.	Leb.	Milz
1	0,82 x 10 ⁶	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	"	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	"	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	"	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	1,64 x 10 ⁶	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	"	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	"	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	"	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	"	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 9 Intrauterine Übertragung, nach intrapéritonealer Infektion konventioneller Ratten mit

Mycoplasma pulmonis, suspendiert

a) in physiologischer NaCl

Nr.	Inokulations- dosis	Trächtig- keit	Mykoplasmenachweis bei Muttertieren			Mykoplasmenachweis bei Föten		
			Ut.	Pl.	Ova.	Organe	Frucht- wasser	Organe
						Leb.	Milz	Leb.

0,7 x 10⁶

1	+	-	+	-	-	-	-	-
2	+	-	+	-	-	-	-	-
3	+	-	+	-	-	-	-	-

entfällt

35

b) in Bouillon

1,22 x 10⁶

4	+	+	-	-	-	-	+	-
5	+	+	-	-	-	-	-	-
6	+	+	-	-	-	-	-	-
7	+	+	-	-	-	-	-	-
8	+	+	-	-	-	-	-	-
9	+	+	-	-	-	-	-	-
10	+	+	-	-	-	-	-	-
11	+	+	-	-	-	-	-	-
12	+	+	-	-	-	-	-	-
13	+	+	-	-	-	-	-	-

Tab. 10

Intrauterine Übertragung, nach intrauteriner Infektion konventioneller Ratten mit

Mycoplasma pulmonis, suspendiert in physiologischer NaCl

Tier Inokulations-	Trächtig-	Mykoplasmennachweis bei Muttertieren				Mykoplasmennachweis bei Föten							
Nr.	dosis	keit	O r g a n e				O r g a n e						
			Ut.	Pl.	Ova.	Lung.	Leb.	Milz	Blut	Frucht-	Lung.	Leb.	Milz
										wasser			

1	0,25 x 10 ⁶	-	+	+	-	-	-	-	-		
2	"	-	+	+	-	-	-	-	-		
3	"	-	+	+	-	-	-	-	-		
4	"	-	+	+	-	-	-	-	-		entfällt
5	"	-	+	+	-	-	-	-	-		
6	"	-	+	+	-	-	-	-	-		
7	"	-	+	+	-	-	-	-	-		
8	"	-	+	+	-	-	-	-	-		
9	"	-	+	+	-	-	-	-	-		

Tab. 11 Intrauterine Übertragung, nach intrathorakaler Infektion konventioneller Ratten mit

Mykoplasma pulmonis

Tier Nr.	Inokulations- dosis	Trächtig- keit	Mykoplasmenachweis bei Muttertieren			Mykoplasmenachweis bei Föten		
			Ut.	Pl.	Ova.	Organe	Frucht- wasser	Organe
					Lung.	Leb.	Milz	
in phys. NaCl								
1	$0,80 \times 10^6$	+	-	-	-	+	-	-
2	"	+	-	-	-	+	-	-
3	"	+	-	-	-	+	-	-
4	"	+	-	-	-	+	-	-
in Bouillon								
5	$1,22 \times 10^6$	+	+	-	-	+	-	+
6	"	+	+	-	-	+	+	-
7	"	+	+	-	-	-	-	-
in Agarhomogenat + Bouillon								
8	$20,00 \times 10^6$	+	+	-	-	+	-	+
9	"	+	+	-	-	+	-	+
10	"	+	+	-	-	+	-	+
11	"	+	+	-	-	+	-	+
12	"	+	+	-	-	+	-	+
13	"	+	+	-	-	+	-	+
14	"	+	+	+	-	+	-	+
15	"	+	+	-	-	+	-	+
16	"	+	+	-	-	+	-	+

Tab. 12

Intrauterine Übertragung, nach intrathorakaler und intravenöser Infektion konventioneller Ratten mit Mycoplasma pulmonis, suspendiert in physiologischer NaCl-Lösung und Bouillon

Tier Nr.	Inokulations- dosis	Trächtig- keit	Ut. Pl.	Ova.	Lung.	Leb.	Milz	Blut	Frucht- wasser	Lung.	Leb.	Milz
Mykoplasmenachweis bei Muttertieren												
O r g a n e												
Mykoplasmenachweis bei Föten												
O r g a n e												
Frucht- wasser												
1	36,3 x 10 ⁶	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
2	"	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
3	"	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
4	"	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
5	"	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
6	"	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
7	"	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
8	"	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
9	"	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
10	"	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
11	"	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
12	"	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
13	"	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
14	"	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
15	"	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
16	"	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+

4. Diskussion

4.1. Zur Methodik

Bei der Züchtung von Mykoplasmen hatte es sich gezeigt, daß bei der Verwendung von Hefeextrakten nach HERS Mykoplasmenausbeute größer und Koloniewachstum charakteristischer (ausgeprägter zentraler Nippel) waren, als mit nach anderen Verfahren hergestellten Hefeextrakten. Das so gewonnene Hefefiltrat muß allerdings bei -25 bis -30 °C aufbewahrt werden, da es bei höheren Temperaturen zu Ausflockungen kommt. Ein besonderes Problem bestand zunächst in dem Einbringen der Mykoplasmen suspension in die Isolatoren für die Infektion der keimfreien Tiere. Für die ersten Inokulationen wurden Mykoplasmen in 2 ml Schraubgläsern in die Schleusen gebracht und eine halbe Stunde durch Einwirken von 2%iger Peressigsäure sterilisiert. Bei den im Anschluß an die Inokulation durchgeführten Titerbestimmungen zeigte sich jedoch eine zum Teil erhebliche Verminderung der KBE. Trotz Dichtung in den Kappen konnte die Peressigsäure offensichtlich in einige Schraubgefäße eindringen. Bei weiteren Versuchen wurden daraufhin verschiedene andere Methoden erprobt, wobei sich dann das Einschweißen der Einmalspritzen in Plastikhüllen als besonders sicher erwiesen hat.

Ein Nachweis von Mykoplasmen ist technisch nicht einfach. Unter anderem bestehen Probleme darin, daß die langsam wachsenden Mykoplasmen schnell durch eine eventuell vorhandene Begleitflora überwuchert werden. Daher ist praktisch eine Isolierung ohne Zusatz von Hemmstoffen bei Material aus konventionellen oder assoziierten Tieren undurchführbar. Als Inhibitoren werden den Isolierungsmedien üblicherweise Penicillin und Thalliumsulfat bzw. Thalliumazetat beigegeben. Bei Verwendung von Penicillin muß die Gefahr der

Bildung von L-Formen in Kauf genommen werden, die nur über Subkultivierungen auf hemmstofffreien Medien oder serologisch differenzierbar sind.

Thalliumverbindungen wiederum sind alleine nicht in der Lage, die Begleitflora sicher zu hemmen, zumindest nicht in einer Konzentration, welche nicht auch gleichzeitig eine Wachstumsdepression der Mykoplasmen darstellt. Aus diesen Gründen wurde von mir für die Isolierung der Mykoplasmen ein Filtrationsverfahren angewandt, mit dem die Nachteile hemmstoffhaltiger Nährmedien reduziert wurden. Mit dem notwendigen Homogenisieren der Organproben war auch der Vorteil verbunden, daß das Anzüchtungsergebnis nicht von zufällig auf den Schnittflächen vorhandenen Mykoplasmen abhängig war, sondern eine genauere Aussage über den Mykoplasmengehalt verschiedener Organe erlaubte. Das angewandte Verfahren hat sich gut bewährt.

4.2. Zur Versuchsanordnung

Zwei Tiergruppen, nämlich die intrauterin und Teile der intraperitoneal inokulierten Tiere wurden zunächst infiziert und nach 15 Tagen gesetzt. Mit dieser Versuchsanordnung sollte die Möglichkeit der fötalen Kontamination durch ein vor der Kopulation infiziertes Endometrium geprüft werden, da die Inkubationszeit der Mykoplasmosen ca. 10 Tage beträgt.

Um das Haften der Mykoplasmen im Rattenorganismus zu erleichtern, wurden als Infektionsgleitschienen PPLO-Agar und PPLO-Broth verwendet. Zum Vergleich wurden auch Mykoplasmasuspensionen in physiologischer NaCl verwendet.

Die einzelnen Applikationsarten wurden nach folgenden Gesichtspunkten ausgewählt:

- a) Die intranasale Inokulation ist von allen Infektionsformen die natürlichste. Mit ihr ist es JUHR (1971) gelungen, Septikämie zu erzeugen.
- b) Durch die intraperitoneale Form sollte geprüft werden, ob eine weitere Ausbreitung im Organismus erfolgt und ob insbesondere der Genitaltraktus und die Ovarien in Mitleidenschaft gezogen werden.
- c) Die intrauterine Inokulation sollte das Verhalten der Föten bei einer zum Zeitpunkt der Konzeption bestehenden Kontamination des Endometriums zeigen.
- d) Durch die intrathorakale Form sollten durch die Infektionsgleitschienen (Agar, Bouillon) unspezifische pulmonale Veränderungen erzielt werden, um die Widerstandsfähigkeit des Organismus zu beeinträchtigen und eine hämatogene Ausbreitung der Mykoplasmen zu erleichtern.
- e) Mit Hilfe der intravenösen Form sollte versucht werden, durch entsprechend hohe Konzentrationen einen direkten Übergang auf die Embryonen zu erzielen und weiterhin die Organe mit der größten Affinität zu ermitteln.
- f) Durch die kombinierte intrathorakale-intravenöse Form sollten die Tiere einem stärkeren Stress ausgesetzt werden, um deutlichere Ergebnisse zu erhalten.

Die Untersuchung von Nasenschleimhaut, Kehlkopf und Lunge wurde bei allen Tieren als Indikator für das natürliche Vorhandensein von Mykoplasmen gewertet. Mykoplasmen in Leber, Milz, Ovarien und Endometrium dienten als Anzeichen einer vorangegangenen, hämatogenen Ausbreitung, in Plazenta und Föten als Indikator einer diaplazentaren Übertragung.

4.3. Besiedlung des Uterus mit Mycoplasma pulmonis nach experimenteller Infektion trächtiger Ratten.

Im Rahmen dieser Untersuchung erwies sich die intraperitoneale Inokulation als die einfachste und sicherste Methode, den Genitaltraktus trächtiger Tiere (Uterus, Ovarien) zu kontaminieren (siehe Tab. 9). Septikämien wurden dabei infolge der relativ niedrigen Titer KBE/ml nicht hervorgerufen, denn weder in abortierten noch durch Sectio caesarea gewonnenen Föten ließen sich Mykoplasmen nachweisen. Sie konnten dagegen aus allen mazerierten Föten isoliert werden.

Die sich bei einigen Tieren mit Beginn der zweiten Graviditätshälfte einstellenden Plazentaablösungen führten im Verlauf der weiteren Gravidität zu fötalen Ernährungsstörungen und dadurch bedingten teilweisen Mazerationen und Aborten. Selten waren alle Föten eines Muttertieres betroffen.

Die Begründung für das häufige, nur auf ein Horn begrenzte Absterben läßt sich aus der zeitlichen Differenz, mit der die beiden Uterushörner bei dieser Infektionsart kontaminiert werden können, ableiten. Die Besiedlung geschieht offensichtlich über die Tuben und erfaßt somit, wie aus der zeitlichen Differenz der ovariellen Veränderungen zu entnehmen ist, zuerst das der Injektionsstelle am nächsten, bzw. in der Injektionsrichtung gelegene Horn. Auch das Verhältnis der mazerierten zu den abortierten Föten ist von dem unterschiedlichen Kontaminationszeitpunkt der Uterushörner abhängig und kann in keine Beziehung zur Kontaminationsstärke gesetzt werden.

Interessanterweise konnte Mycoplasma pulmonis in stärkerem Maße von den abgestoßenen Bezirken der Plazente, als von den in fester Verbindung zum Endometrium bestehenden Teilen isoliert werden. Diese Erscheinung ist auf die Eigenschaft der Mykoplasmen, sich auf geschädigtem Gewebe besonders

schnell zu entwickeln, zurückzuführen.

Somit besteht an der Plazenta ein Infektionsgeschehen, das von den peripheren Bezirken nach dem Zentrum hin fortschreitet. Es ist anzunehmen, daß die Mykoplasmen auch den auslösenden Faktor für die Ablösung der Placenta darstellen, da durch bakteriologische Untersuchungen keine anderen Agenzien festgestellt werden konnten. Solche Veränderungen kommen besonders nach Infektionen mit hohen Mykoplasmandosen zustande. Das läßt darauf schließen, daß nur massive Kontaminationen des Epithels zu einer Placentitis führen und damit zu einem frühzeitigen Abstoßen der Placenta. Weiterhin konnte Mycoplasma pulmonis in infizierten Uteri normalerweise nur von den Oberflächen der Plazenten isoliert werden, im Inneren nur bei nicht oder unzureichend mit Lorasol ^(R) behandelten Organen.

Diese Befunde lassen daher den Schluß zu, daß die Mykoplasmen sich überwiegend in der äußeren Schicht der Placenta befinden und keine Tendenz zeigen, in die tieferen Schichten bzw. in die Kapillaren vorzudringen und die Föten diaplacentar zu infizieren.

Bei den mazerierten Föten gelang der Mycoplasma pulmonis Nachweis in allen Fällen. Auf Grund der negativen Ergebnisse bei abortierten Föten kann jedoch angenommen werden, daß es zu einer Kontamination erst nach dem Absterben gekommen ist. Somit scheinen sich die Auswirkungen der Kontamination des Endometriums während der Gravidität auf die Föten nur sekundär dahingehend auszuwirken, daß es zu frühzeitigem Absterben und spontanen Aborten kommen kann.

Allerdings muß darauf hingewiesen werden, daß alle Tiere mit Ausnahme einer leichten Peritonitis keinen Stresseinwirkungen ausgesetzt waren, sodaß die Möglichkeit der fötalen Kontamination bei stärkeren Belastungen des Organismus nicht ganz auszuschließen ist.

4.4. Die ovarielle Kontamination als Voraussetzung für infizierte Eizellen

Für eine sichere Kontamination der Ovarien eignet sich die intraperitoneale Inokulation und zwar sowohl mit Mykoplasmasuspensionen in physiologischer NaCl-Lösung, als auch in PPLO-Broth am besten. Als weitere Möglichkeit besteht sowohl die intrathorakale als auch die intrauterine Infektion. Allerdings lassen sich bei letzterer Methode einige Unsicherheitsfaktoren nicht ohne weiteres ausschließen. Sie sind dadurch bedingt, daß zur Durchführung dieser intrauterinen Infektionsart eine Laparatomie notwendig ist. Dabei kann nach beendeter Inokulation Suspension aus dem Stichkanal austreten, womit der gleiche Effekt wie bei der intraperitonealen Inokulation gegeben wäre.

Nach der Infektion ließen sich zunächst Mykoplasmen von den serösen Überzügen der Ovarien isolieren, dagegen aus dem Inneren erst nach 5 - 6 Tagen. Ab dem 15. Tag post inokulationem bestanden Fertilitätsstörungen. Der Grund lag in den beidseitig makroskopisch veränderten Ovarien, bei gleichzeitig ungestörtem Allgemeinbefinden.

Nach Ablauf weiterer 10 - 15 Tage bestanden meist einseitig zystische Entartungen in Verbindung mit eitriger Einschmelzung des ovariellen Parenchyms.

Auffällig war dabei, daß die Veränderungen bei allen für diesen Versuch verwendeten Inokulationsarten einschließlich der intrathorakalen Form an den Ovarien stets erheblich umfangreicher waren, als die am Endometrium. Selbst bei der intrauterinen Inokulation war das Endometrium weniger stark verändert als die Ovarien. Offenbar ist die Affinität der Mykoplasmen innerhalb des Genitaltraktes zu den Ovarien am größten.

Ob die Veränderungen als Folge einer Septikämie anzusehen sind, oder ob es sich um eine vom Endometrium aufsteigende

Infektion handelt, konnte nicht geklärt werden. Wahrscheinlich ist, daß nur das Endometrium infiziert wird und es über eine bestehende Endometritis und Salpingitis zur Oophoritis kommen kann. Dafür spricht, daß bei einem Befall der Ovarien zwar stets Mykoplasmen im Endometrium vorlagen, während dagegen umgekehrt beim Befall des Endometriums nicht immer gleichzeitig Mykoplasmen aus den Ovarien isoliert werden konnten. Außerdem ließen sich auch bei den diaplazentaren Übertragungsversuchen Infektionen der Ovarien nicht immer nachweisen. Auf Grund der Affinität der Ovarien zu Mykoplasmen muß angenommen werden, daß die Eizellen ebenfalls kontaminiert werden können. Ob sie dadurch geschädigt sind und ob sie noch zur Befruchtung kommen, ist fraglich, da keines der am 15. Tag gesetzten Tiere trächtig wurde. Fertilitätsstörungen wurden nach den Untersuchungsergebnissen auf jeden Fall hervorgerufen. Inwieweit diese Ergebnisse aber auf die natürlichen Verhältnisse übertragbar sind, erscheint fraglich, da weder Infektionsmodus noch Mykoplasmandosis vergleichbar sind.

4.5. Möglichkeiten der diaplazentaren Übertragung

Eine Septikämie und die damit verbundenen diaplazentaren Übertragungen konnten nur mit der intrathorakalen Inokulation erzielt werden, wobei Mykoplasmen bei den Muttertieren vom Endometrium, in Plazenta und in den Föten isoliert wurden. Im Gegensatz zu den Angaben von JUHR (12) ließen sie sich in anderen Organen der Muttertiere nicht nachweisen. Nur in den Organen der Föten konnten von ganz wenigen Ausnahmen abgesehen, sowohl aus Milz und Leber als auch aus der Lunge, Mykoplasmen isoliert werden.

Die verschiedenen Inokulationsformen mit ihren unterschiedlichen Ergebnissen lassen erkennen, daß für die Generalisation und damit für die diaplazentare Übertragung nicht

allein die Anzahl der KBE und die Applikationsformen ausschlaggebend sind, sonder noch andere Faktoren berücksichtigt werden müssen.

Die Mykoplasmen sind ursprünglich wenig pathogene Keime, die nur auf der Schleimhaut des Respirationstraktes leben, und keine große Tendenz zeigen, zu generalisieren. Es gehört schon ein massiver Streß und eine dem Streß entsprechende Mykoplasmenzahl dazu, um das Wirt - Mykoplasmenverhältnis in der Form zu stören, daß es zu einer Besiedlung weiterer Organe kommt. Haften und Vermehrung der Mykoplasmen in den Organen ist wiederum von deren Beschaffenheit und Aufbau abhängig. Da die Mykoplasmen intraepithelial leben, ist es nicht verwunderlich, daß Organe mit Epithel bevorzugt werden. Ein weiteres Charakteristikum besteht in der relativ langsamen Vermehrung. Damit kommt zu dem Streß auch noch ein Zeitfaktor hinzu. Das bedeutet insgesamt, daß die Wahrscheinlichkeit einer Generalisation proportional zu bestehendem Streß, Streßdauer und der Anzahl der KBE stehen dürfte, ein Haften der Kontamination an den Organen jedoch von der Affinität und der Kontaminationsintensität abhängig sein wird. Bei der Streßdauer ist zu berücksichtigen, daß vermutlich eine dem langsamen Wachstum angepasste Zeit der Einwirkung, unabhängig von der Streßstärke, unbedingte Voraussetzung sein muß. Das heißt, daß ein geringer Dauerstreß nicht durch einen starken momentanen Streß ersetzt werden kann.

Die aufgeführten Voraussetzungen für das Zustandekommen einer Generalisation waren offensichtlich im Rahmen dieser Versuche nur bei der intrathorakalen Inokulationsform auf PPLO-Agar-Homogenat-Basis gegeben.

Zu den primären Entzündungen im Thoraxbereich mit fibrinösen Pleuraauflagerungen, Fibrinausfüllungen des Mediastinums und Inaktivierung ganzer Lungenflügel durch Fibrin-

massen kam die hohe Mykoplasmenzahl dazu. Solche Veränderungen und schlecht ventilierte Lungenteile bieten besonders günstige Vermehrungsbedingungen für Mykoplasmen. Damit waren die weiteren Voraussetzungen für eine metastatische Ausbreitung in andere Organe erreicht. Offensichtlich kommt es nur unter solchen Bedingungen auch zu einer Durchbrechung der Plazentaschranke und zu einer Infektion der Föten.

4.6. Die Bedeutung der intrauterinen Übertragung von Mycoplasma pulmonis auf Föten für die Versuchstierzucht.

Aus den Vorversuchen ist ersichtlich, daß bei den konventionellen Tieren mit einem Alter von 20 - 300 Tagen im Nasen-Rachenraum 81,3 % kontaminiert waren. Dabei ist zu berücksichtigen, daß einerseits die Häufigkeit der Kontaminationen mit zunehmendem Alter steigt und andererseits in den tieferen Atmungswegen (Lunge) aber nur rund halb so häufig (ca. 40 %) Mykoplasmen vorkommen. Bei Tieren bis zu 20 Tagen konnten Mykoplasmen in keinem Fall nachgewiesen werden.

Weibliche Tiere mit kontaminierter Nasen- und Rachenschleimhaut zeigten nach der Gravidität keine Veränderung der Infektionslage. Selbst Temperaturschwankungen um $\pm 9^{\circ}\text{C}$ jeweils im Abstand von 3 Tagen und schlechte Ventilation der Lebensräume konnten an diesem Ergebnis nichts ändern. Daraus muß gefolgert werden, daß weder die Gravidität allein noch ihre Verbindung mit kurzfristigen geringen Streßsituationen eine Begünstigung für eine Aktivierung der Mykoplasmeninfektionen darstellt. Erst bei erheblichen Verschlechterungen der Lebensbedingungen und länger

dauernden Streßeinwirkungen dürfte damit zu rechnen sein. Diese Folgerung entspricht den in den Vorversuchen gewonnenen Erkenntnissen. Obwohl 81,2 % der weiblichen Tiere einer konventionellen Zucht kontaminiert waren und bei 10 % eine gleichzeitige Kontamination des Endometriums vorlag, konnten bei 90 untersuchten Jungtieren, aus 45 verschiedenen Würfen, aus diesem Bestand im Alter von 1 - 20 Tagen keine Mykoplasmen nachgewiesen werden (siehe Tab. 3).

Besonders wichtig erscheint mir jedoch die Tatsache, daß sowohl bei keimfreien Tieren aller Altersklassen, als auch bei in keimfreien Status überführten Tieren, keine Mykoplasmen nachgewiesen werden konnten (siehe Tab. 3).

Somit lassen sich die Untersuchungsergebnisse dahingehend zusammenfassen, daß einer intrauterinen Übertragung von *Mycoplasma pulmonis* bei Beachtung der streßfreien Rattenhaltung keine Bedeutung beizumessen ist.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde von einer konventionellen, mit Mykoplasmen kontaminierten Rattenzuchtanlage ein *Mycoplasma pulmonis* Stamm isoliert, welcher als Grundlage für eine Anzahl von Kontaminationsversuchen diente. Die Zielsetzung dieser Versuchsreihe bestand in der Beantwortung der Frage, inwieweit eine intrauterine Übertragung von *Mycoplasma pulmonis* bei Ratten in Betracht kommt und welche Bedeutung die intrauterine Übertragung auf Föten im Rahmen der Versuchstierzucht beizumessen ist.

Dazu dienten folgende Untersuchungen:

1. über das Vorkommen von *Mycoplasma pulmonis* im Respirations- und Genitaltrakt eines konventionellen Zuchtbestandes
2. über das Vorkommen von *Mycoplasma pulmonis* bei konventionellen Jungratten im Alter bis zu 20 Tagen,
3. über das Vorkommen von *Mycoplasma pulmonis* bei keimfreien Ratten
4. über das Vorkommen von *Mycoplasma pulmonis* bei keimfreien und von konventionellen, kontaminierten Muttertieren gewonnenen Ratten
5. die Auswirkung einer während der Gravidität hervorgerufenen Infektion des Endometriums auf die Föten
6. die fötale Kontamination durch eine ovarielle Infektion
7. und die diaplazentare Übertragung auf die Föten.

Als Grundlage für die durchgeführten Kontaminations- und Übertragungsversuche dienten verschiedene Inokulationsmethoden und Inokulationsgrundlagen. Die Versuche wurden

sowohl an keimfreien als auch an konventionellen Ratten durchgeführt. Insgesamt kamen 441 Ratten zur Untersuchung. Davon wurden für die experimentelle Infektion 56 keimfreie und 63 konventionelle Tiere benutzt.

Der konventionelle Zuchtbestand erwies sich zu 81,2 % als kontaminiert. Dagegen konnten sowohl bei 90 jungen (1 - 3 Tage alten) konventionellen Tieren, als auch bei 61 keimfreien erwachsenen Ratten keine Mykoplasmen nachgewiesen werden.

Durch experimentelle Infektionen des Endometriums während der Gravidität konnten zwar Aborte, jedoch keine Kontaminationen der Föten hervorgerufen werden.

Infektionen der Ovarien nach intraperitonealer und intrauteriner Inokulation mit *Mycoplasma pulmonis* führten zur Sterilität der Tiere.

Eine regelmäßige diaplazentare Übertragung von *Mycoplasma pulmonis* auf Föten konnte nur nach künstlicher intrathorakaler Infektion in Verbindung mit schweren entzündlichen Veränderungen im Brustraum beobachtet werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Andrew C.H., Welch F.V. A motile organism of the pleuro-
 pneumonia group.
 J. Path. Bact. 70, 245-246 (1955)
- CLYDE, W.A. Mycoplasma species identifica-
 tion based upon growth inhibi-
 tion by specific antisera.
 J. Immunol. 92, 958 (1964)
- FLYNN, R.J., SIMMKINS, Uterine infection in mice.
R.C., BRENNAN, P.C., Z. Versuchstierkd. 10, 131-136
FRITZ, T.E.: (1968)
- Forster, H.L.: Specific pathogen - free animals
 p. 103-138 In: W. Lane -
 Petter (ed)
- Freundt, E.A.: Morphology and classification
 of the PPLO.
 Ann. NY. Acad. Sc. 79, 312 (1960)
- GÄRTNER K.: Untersuchung zur Kontagiosität
 der "Chronic Respiratory Disease"
 der Ratte (CRD)
 Z. Versuchstierkd. 10, 82 (1968)
- GRAHAM, W.R.: Recovery of a PPLO from the geni-
 talia of the female albino rat.
 Lab. Anim. Care 13, 719-724 (1963)

- Jerstad, A.C. et al.: Preliminary report of probable egg transmission of infectious sinusitis of turkey.
Vet. Med. 54, 272-273 (1949)
- JUHR, N.C.: Mykoplasmen bei keimfreien Ratten und Mäusen
Z. Versuchstierkd. 12, 318 (1970)
- JUHR, N.C.: Untersuchung zur chronischen Murinen Pneumonie
Pathogenese der Mycoplasma pulmonis Infektion bei der Ratte.
Z. Versuchstierkd. 13, 217 (1971)
- JUHR N.C.: Untersuchung zur chronischen Murinen Pneumonie. Vorkommen und Resistenz von Mycoplasma pulmonis.
Z. Versuchstierkd. 13, 210-316 (1971)
- KLIENEBERGER - NOBEL, E. and CHENG, K.K.: On the association of the PPLO with experimentally produced bronchiectasis in rats.
J. Path.Bact. 70, 245-246 (1955)
- Lemcke R.M.: Association of PPLO infection and antibody response in rats and mice.
J. Hyg. (Camb) 59, 401-402 (1961)
- Lemcke R.M.: Media for the mycoplasmataceae.
Lab. Pract., 14, 712 (1965)

- LUTSKY, I., ORGANICK, A.: Recovery of mycoplasma from gnotobiotic systems.
Lab. Anim. Care. 18, 610-615 (1968)
- Mantany C.F. et. al.: Studies on egg transmission of the agent of infectious sinusitis of turkeys.
Proceeding Book A.V.M.A. 310-314 (1955)
- Nelson J.B. et. al.: The incidence of mittle ear infection and pneumonia in albino rats at different ages.
J. Infect. Dis. 46, 53-63 (1930)
- Nelson J.B.: Respiratory infection of rats and mice with emphasis on indigenous mycoplasmas.
Pathology of Laboratory Rats and Mice (ed.E. Cotchin and F.J.C. Roe)
Blackwell-Verl., Oxford and Edinburgh, 1967, S. 263
- Nelson J.B.: The behavior of murine PPLO in Hela cell cultures.
Ann. NY. Acad. Sc. 79, 450-57 (1960)
- O'Connel et al.: Aerosol as a source of widespread Mycoplasma contamination of tissue cultures.
Appl. Microbiol. 12, 337-342 (1964)

- Reyniers J.A.: Germfree life studies (=Lobund-report I)
Notre Dame University Press, Notre Dame, Ind., 1946
- Röckl H., Nasemann Th.: Die Pleuropneumonia-ähnlichen Organismen (PPL0) und ihre Bedeutung für die unspezifische Urethritis
Zbl. Bakt. I Orig. 156, 313 (1956)
- Schimmel D.: Habil.-Schrift, X Jena 1967
- Wagner, : Determination of germ free status, Ann. NY. Acad. Sci. 78, 89-101 (1959)
- SCHÜTZE, E.: Mykoplasma-Modell-Infektion bei kleinen Laboratoriumstieren.
Zbl. Bakt. I Orig. 208, 301-320 (1968)
- Wederisch E.J., Pollard M.: Examination of germfree rats and mice for PPL0.
Bact. Proc. 66, 206 (1963)
- Wildführ G.: Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Epidemiologie II
VEB G. Thieme Verlag, Leipzig 1961

Herrn Professor Dr. Th. SCHLIESSER darf ich am Ende dieser Arbeit für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte hilfreiche Unterstützung danken.

Ebenfalls gilt mein Dank dem Leiter der Sektion Gnotobiotik der Universität Ulm, Herrn Dr.H. MEYER für die großzügig gewährten Arbeitsbedingungen in seinem Institut, mit dessen Hilfe es nur möglich war, diese Arbeit zu planen und zu vollenden.

LEBENS LAUF

Am 12. Juni 1940 wurde ich als Sohn des Architekten Waldemar Vahldieck und seiner Ehefrau Edith, geb. Vahldieck, in Stendal/Altmark DDR geboren.

Im Jahre 1945 mußten wir unseren Wohnsitz in Deutsch-Krone in Pommern verlassen und kamen nach einigen Zwischenaufenthalten nach Bergen/Dumme in Niedersachsen. Hier besuchte ich 4 Jahre die Volksschule und im Anschluß daran 6 Monate die Mittelschule in Klenze. Infolge der Umsiedlung nach Oberursel/Taunus in Hessen besuchte ich für weitere 6 Monate das dortige Oberrealgymnasium und wurde nach einem weiteren Umzug nach Frankfurt/Main in das dortige Leibnitz-Realgymnasium umgeschult.

Durch die Auswirkungen eines Schädelbruchs konnte ich die Schule für längere Zeit nicht oder nur unregelmäßig besuchen und begann daher 1954 nochmals meine schulische Ausbildung an dem Neusprachlich-Mathematischen Realgymnasium in Kelkheim/Taunus, wo ich auch im März 63 meine Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1963 begann ich mein tiermedizinisches Studium an der Justus-Liebig-Universität in Gießen, wo ich im Wintersemester 1969/70 das Tierärztliche Examen absolvierte.

Im Anschluß daran war ich für einige Zeit als Praxisvertreter tätig und begann am 1. März 1971 mit meiner augenblicklichen Beschäftigung als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Sektion Gnotobiotik der Universität Ulm.

